Quantitative Bestimmung der freien Aminosäuren und Peptide in der Linse von Schweine- und Rinderaugen

Wenzel Böckenhoff

Aus der Augenklinik der Universität M ü n c h e n
Vorstand: Professor Dr. med. W. Rohrschneider

Quantitative Bestimmung der freien Aminosäuren und Peptide in der Linse von Schweine- und Rinderaugen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Wenzel Böckenhoff
Erle bei Dorsten, Westf., Böckenhof

München 1958

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Referent: Dozent Dr.H.J.Küchle
Korreferent: Professor Dr.med.W.Rohrschneider
Dekan: Professor Dr.med.K.Kolle
Tag der mündlichen Prüfung: 4. 8. 1959

Inhaltsverzeichnis:

Seite

I. Einleitung und Fragestellung 2

II. Bisheriges Schrifttum 3

III. Methodik der eigenen Untersuchungen..... 6

A. Quantitative Bestimmung des Aminostickstoffs der freien Aminosäuren in Rinder- und Schweinelinsen 6

1.) Vorbemerkungen 6

2.) Verwendete Chemikalien 7

3.) Benutzte Apparatur 8

4.) Gewinnung der Linsen 11

5.) Enteiweißen und Eindampfen der Linse.. 11

6.) Ninhydrinreaktion 12

7.) Titration 13

8.) Leeranalyse 14

9.) Berechnung 14

10.) Tabelle II: Aminostickstoff der freien Aminosäuren in der Linse von Schwein und Rind..... 19

B. Quantitative Bestimmung des Aminostickstoffs der Peptide in Rinder- und Schweinelinsen 16

1.) Vorbemerkungen 16

2.) Verwendete Chemikalien 17

3.) Zusätzliche Apparatur für die Peptidanalysen 17

4.) Hydrolyse 17

5.) Tabelle III 21

IV. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen 18

1.) Aminostickstoff der freien Aminosäuren 18

2.) Aminostickstoff der Peptide 20

V. Besprechung der Ergebnisse 22

VI. Zusammenfassung 24

VII. Literaturverzeichnis 25

I. Einleitung und Fragestellung

Die Linse des Säugetierauges nimmt im Stoffwechsel des Körpers insofern eine besondere Stellung ein, als sie nicht durch Blutgefäße versorgt wird. Sie ist mit den feinen Fasern der Zonula-Zinnii an den Ciliarkörperfortsätzen ringsum aufgehängt und liegt hinten dem Glaskörper an, der seinerseits durch eine Membran abgeschlossen ist. Vorne wird sie durch das Kammerwasser der hinteren und vorderen Augenkammer umspült. Die Aufnahme von Nahrungsstoffen und die Abgabe von Stoffwechselendprodukten ist somit auf die vordere Linsenfläche beschränkt. Die erwähnten Stoffe können nur aus dem Kammerwasser stammen oder in dieses hinein abgegeben werden, wobei in jeder Richtung noch die vordere Linsenkapsel als Schranke zu überwinden ist.

Im Rahmen des komplizierten Linsenstoffwechsels, dem in den letzten Jahren von vielen Seiten erneut große Aufmerksamkeit entgegengebracht wurde, ist auch der der Eiweißkörper und ihrer Bausteine, der Aminosäuren und Peptide, sicher von erheblicher Bedeutung.

Die im letzten Jahrzehnt sehr verfeinerten Methoden der Aminosäuren- und Peptidanalyse ermöglichen es jetzt, auch sehr geringe Mengen dieser Substanzen in organischen Flüssigkeiten quantitativ zu bestimmen. So sind eine Reihe freier Aminosäuren im Kammerwasser und ebenso in dem nach Eiweißausfällung zurückbleibenden eiweißfreien Linsenextrakt nachgewiesen worden. Die Aminosäuren und Peptide sind im Hinblick auf das Wachstum der Linse insofern von besonderem Interesse, als nur aus ihnen das Eiweiß aufgebaut werden kann, das für die Linsenfasern spezifisch ist und dessen Veränderungen zur Trübung der Linsensubstanz, dem grauen Star, führen. Untersuchungen über Auf- und Abbau des Linseneiweißes sind daher im Rahmen einer Klärung der physiologischen und pathologischen Vorgänge des Linsenwachstums und der Starbildung von großer Bedeutung.

In diesem Zusammenhang erscheint es bemerkenswert, daß über den Gehalt des eiweißfreien Linsenextraktes an freien Aminosäuren und Peptiden bisher kaum quantitative Untersuchungen vorliegen. Dies geht aus der folgenden Schrifttumsübersicht eindeutig hervor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, in dieser Richtung weitere Bestimmungen an der Linse von Rind und Schwein vorzunehmen.

II. Bisheriges Schrifttum

Während, wie schon bemerkt, über den Gehalt der Linse an freien Aminosäuren bisher nur vereinzelte Mitteilungen vorliegen, ist eine Bestimmung der Gesamt-Peptide, wie sie bei den eigenen Untersuchungen nach der Methode von van Slyke vorgenommen wurde, bisher noch nicht ausgeführt worden. In chronologischer Reihenfolge aufgeführt, sind im Zusammenhang mit der eigenen Arbeit nur wenige Mitteilungen von Bedeutung. Bezüglich ihrer Bewertung ist ausserdem zu bedenken, daß die meisten Bestimmungsmethoden vor 1945 unverhältnismässig große Fehler und Ungenauigkeiten aufwiesen.

De Vecchi (1) stellte 1936 durch colorimetrische Bestimmung der freien Aminosäuren nach Folin fest, daß der Aminosäuregehalt der menschlichen Starlinse erhöht ist. In Versuchen an Kaninchen fand er, daß der durchschnittliche Aminosäuregehalt der gesunden Linse 35,98 mg% betrug, während bei durch Naphthalinvergiftung getrübten Linsen der Mittelwert der Aminosäuren mit 39,20 mg% höher lag. Der Verfasser vermutete, daß die unter diesen Versuchsbedingungen zu beobachtende Erhöhung des Aminosäuregehaltes durch hydrolytische Spaltung der Linsenproteine bedingt sei.

Nach der gleichen Methode nahm de Vecchi (2) 1937 weitere Untersuchungen an menschlichen Linsen vor. Leichenlinsen hatten, 4 - 6 Stunden nach dem Tode entnommen,

einen mittleren Gehalt an Aminosäuren von 44,05 mg%. Nach 2½ bis 3 Tagen untersuchte Leichenlinsen wiesen eine beträchtliche Erhöhung dieses Wertes auf 77,21 mg% auf, was auf den inzwischen vor sich gegangenen fermentativen Abbau des Eiweißes nach dem Tode zurückzuführen sein dürfte. Bei Linsen mit "hartem" Star ergab sich ein Mittelwert von 60,11 mg%, bei solchen mit "weichem" Star ein Mittelwert von 79,87 mg% Aminosäuren. Den höchsten Aminosäurengehalt wies bei den Untersuchungen von d e V e c c h i die Starlinse eines Diabetikers mit 93,6 mg% auf.

M i l a n o (3) nahm 1938 Bestimmungen der freien Aminosäure an Linsen von parathyreoidektomierten Kaninchen vor, ebenfalls nach der Colorimeter-Methode nach Folin. Der Mittelwert bei den kranken Tieren lag bei 48 mg% Aminostickstoff, während der der gesunden Tiere nur 40,5 mg% betrug.

Nach einer Bestrahlung von Kaninchenaugen mit ultraviolettem Licht stellte M i l a n o (4) ein Absinken des Aminostickstoffgehaltes der Linse fest. Dabei nahm deren Gewicht bei gleichzeitiger Eintrübung zu. Für die Verminderung der Aminosäuren machte M i l a n o (4) eine Photolyse derselben verantwortlich, wobei zum Beispiel Glykokoll bei Bestrahlung in Formaldehyd, Ammoniak und Kohlendioxyd übergehen soll. Außerdem, so gibt er an, könnte durch die Bestrahlung eine Erhöhung der Linsenkapseldurchlässigkeit erfolgen, und somit ein Auswandern der Aminosäuren in das Kammerwasser begünstigt werden.

M a l a t e s t a (5) wandte mit der papierchromatographischen Trennung der freien Aminosäuren der intraokulären Flüssigkeiten ein aufschlußreiches Verfahren an. Wenn diese Bestimmung auch nur qualitativ ist, so läßt sich doch aus der Größe und der Intensität der Farbflecke des Chromatogramms ein Rückschluß darauf ziehen, in welchem Mengenverhältnis die freien Aminosäuren etwa zueinander stehen.

Die aus diesen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse ermöglichten M a l a t e s t a (5) genauere Untersuchungen an Linse, Kammerwasser, Glaskörper und Blut von Rindern vorzunehmen. Er stellte dabei fest, daß im Blut und in der Augenflüssigkeit freie Aminosäuren annähernd in gleicher Zahl und Konzentration vorhanden sind, wie es aus seiner nachstehenden Tabelle I ersichtlich ist.

Tabelle I

Die Aminosäurenzusammensetzung von Augengeweben und -Flüssigkeiten (nach M a l a t e s t a)

Aminosäuren	Blut	Kammer-wasser	*) halbfester Teil des Glaskörpers	Linse
Phosphoserin	+++	++	-	++
Phosphocolamin	+	-	-	+
Lysin	+	+	-	-
Asparaginsäure	++	+	+	+
Glutaminsäure	++	++	++	++
Alanin	++	++	++	++
Glycin	++	++	++	++
Glutamin	++	++	++	++
β-Alanin	+	-	-	-
Arginin	+	+	-	-
Serin	++	++	++	++
Threosin	+	+	-	Spuren
α-amino-Buttersäure	+	+	-	-
Prolin	+	-	-	-
Taurin	++	++	++	++
Valin	++	++	++	++
Leucin	++	++	Spuren	+
Tyrosin	+	-	-	-
Phenylalanin	+	Spuren	-	-

*) M a l a t e s t a (6) zentrifugierte Glaskörper und erhielt dabei als kleineren Anteil eine halbfeste Masse, die hier untersucht wurde und als größeren Anteil eine flüssige Masse, die in ihrer Zusammensetzung dem Kammerwasser gleichkam, deren Aminosäurenzusammensetzung jedoch in obiger Tabelle nicht mit aufgeführt ist.

M a l a t e s t a (6) fand in der Linse größere Mengen von Phosphoserin, Glutamin, Glycin, Alanin, Serin und Taurin; in geringerer Menge waren vorhanden: Phosphocolamin, Glutaminsäure, Valin, Leucin und Asparaginsäure; Threosin war nur in Spuren nachweisbar.

Da die Linse ausschließlich vom Kammerwasser ernährt wird und an dieses ihre Stoffwechselprodukte auch wieder abgibt, erscheint es bemerkenswert, daß M a l a t e s t a(6) in der Linse Phosphocolamin fand, welches im Kammerwasser nicht vorhanden war. Dieses muß also in der Linse aufgebaut werden können. Den Grund für das Fehlen von Lysin, Arginin, α-amino-Buttersäure und Phenylalanin vermutet M a l a t e - s t a (6) in der Undurchlässigkeit der Linsenkapsel für diese Stoffe.

III. Methodik der eigenen Untersuchungen

A. Quantitative Bestimmung des Aminostickstoffs der freien Aminosäuren in Rinder- und Schweinelinsen

1. Vorbemerkungen

Zur quantitativen Bestimmung des Aminostickstoffs der freien Aminosäuren entwickelte v a n S l y k e (7) zwei Verfahren. Einmal die manometrische Methode (7), die sich für die Bestimmung von kleinsten Mengen Aminostickstoff (unter 0,15 mg) besonders eignet. Die zweite Methode basiert auf der Ninhydrinreaktion (7), die auch bei den eigenen Versuchen angewandt wurde.

Bei diesem Verfahren wird der Aminostickstoff mit der Ninhydrinreaktion bestimmt. Nach Decarboxylierung der Aminosäuren durch Ninhydrin wird das dabei freigewordene Kohlendioxyd in einer vorgegebenen Menge Bariumhydroxyd aufgefangen und dessen Überschuss anschließend durch Titration bestimmt. V a n S l y k e (7) entwickelte je nach der Menge des zu erwartenden Aminostickstoffs drei Abwandlungen der Methode:

Makroanalyse für Mengen zwischen 5 und 3 mg Aminostickstoff
Mikroanalyse " " " 1 und 0,15 mg "
Submikroanalyse unter 0,15 mg "
Die einzelnen Analysen unterscheiden sich voneinander durch die Verwendung verschiedener Konzentrationen der gleichen Reagentien. Nach van Slyke (7) liegt die Fehlergrenze bei seinen Analysen unter 1%.

In ausgedehnten eigenen Vorversuchen wurde zunächst festgestellt, daß die in einer Rinderlinse enthaltenen Mengen an Aminostickstoff größenordnungsmäßig in einem Bereich liegen, der die Anwendung der Mikroanalyse angezeigt erscheinen ließ. Für die Bestimmung des Aminostickstoffs in Schweinelinsen war es notwendig, jeweils drei Linsen zusammen aufzuarbeiten, um eine Mikroanalyse durchführen zu können.

Durch die Hydrolyse mit Mineralsäuren erleiden die Aminosäuren teilweise, besonders in Anwesenheit von Kohlehydrat, mehr oder weniger starke Racemisierung und weitgehende chemische Veränderungen. Tryptophan z.B. wird, wie bekannt, vollständig zerstört. Hydrolysiert man in reiner Form mit hochprozentigen Säuren, dann bleiben die Aminosäuren ziemlich stabil (Kotake (8)). Nach Untersuchungen von Tristram (99) führt Kochen und Hydrolyse von Arginin und Histidin zu einem Verlust von 20% der Substanzen. Wenn auch nach den bisher vorliegenden Untersuchungen die Linse keine der soeben erwähnten Aminosäuren enthält, so ist doch auch bei den eigenen Versuchen mit einem gewissen, durch die Hydrolyse bedingten Verlust an Aminostickstoff zu rechnen. Die ermittelten Mengen Amino-Stickstoff stellen daher einen Mindestgehalt dar.

2. Verwendete Chemikalien

a) Alkoholus absolutus, zum Enteiweißen der Linse,
b) Octylalkohol, zum Verhindern des Überschäumens,

c) Bimsstein, gegen Siedeverzug,
d) Phenolphthalein als Indikator,
e) Ninhydrin,
f) Natronlauge zur Neutralisation,
g) 0,125 normale Bariumhydroxydlösung, die 2% Bariumchlorid enthält, um einen vollständigen Niederschlag von Bariumkarbonat zu gewähren.
h) Citratpuffer, um ein PH von 4,7 zu erhalten; bestehend aus 17,65 g $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ mit 8,40 g Citronensäure verrieben und in einer Schliff-Flasche bei 100° getrocknet.
i) 0,02855 normale Salzsäurelösung zur Titration.

3. Benutzte Apparatur (s.Abb.1 u.2)

Die verwandte Apparatur besteht aus 3 Teilen:

a.) Zwei Erlenmayerkolben von 25 cm^2 und einem Kolbenhalsdurchmesser von 2,5 cm sind durch Gummimanschetten an einem 12 cm langen U-Rohr befestigt. Kolbenhals und U-Rohransätze müssen den gleichen äußeren Durchmesser haben. Oben am U-Rohr befindet sich ein Einweg-Hahn (a); er ist durch eine Gummimanschette mit dem Rohr verbunden. Der Abstand Hahn - U-Rohr soll möglichst klein sein.

b.) Ein Gummiballon (Fassungsvermögen etwa drei Liter), der Stickstoff enthält, ist mit seiner Öffnung an einem Ende eines 3-röhrigen Schaltstücks befestigt, in dem sich in der Mitte ein Zwei-Wege-Hahn (b) befindet. Das zweite Ende des Schaltstücks ist mit dem eben beschriebenen U-Rohr durch einen Unterdruckschlauch verbunden. Das dritte Ende führt zu

c.) einer Wasserstrahlpumpe, der ein zweiter Zwei-Wege-Hahn (c) vorgeschaltet ist.

Damit die Beschreibung des Versuchsverlaufs anschaulicher wird, geben die folgenden Zeichnungen die Stellung der Hähne während der einzelnen Versuchsstadien wieder.

Abb. 1. Benutzte Apparatur.

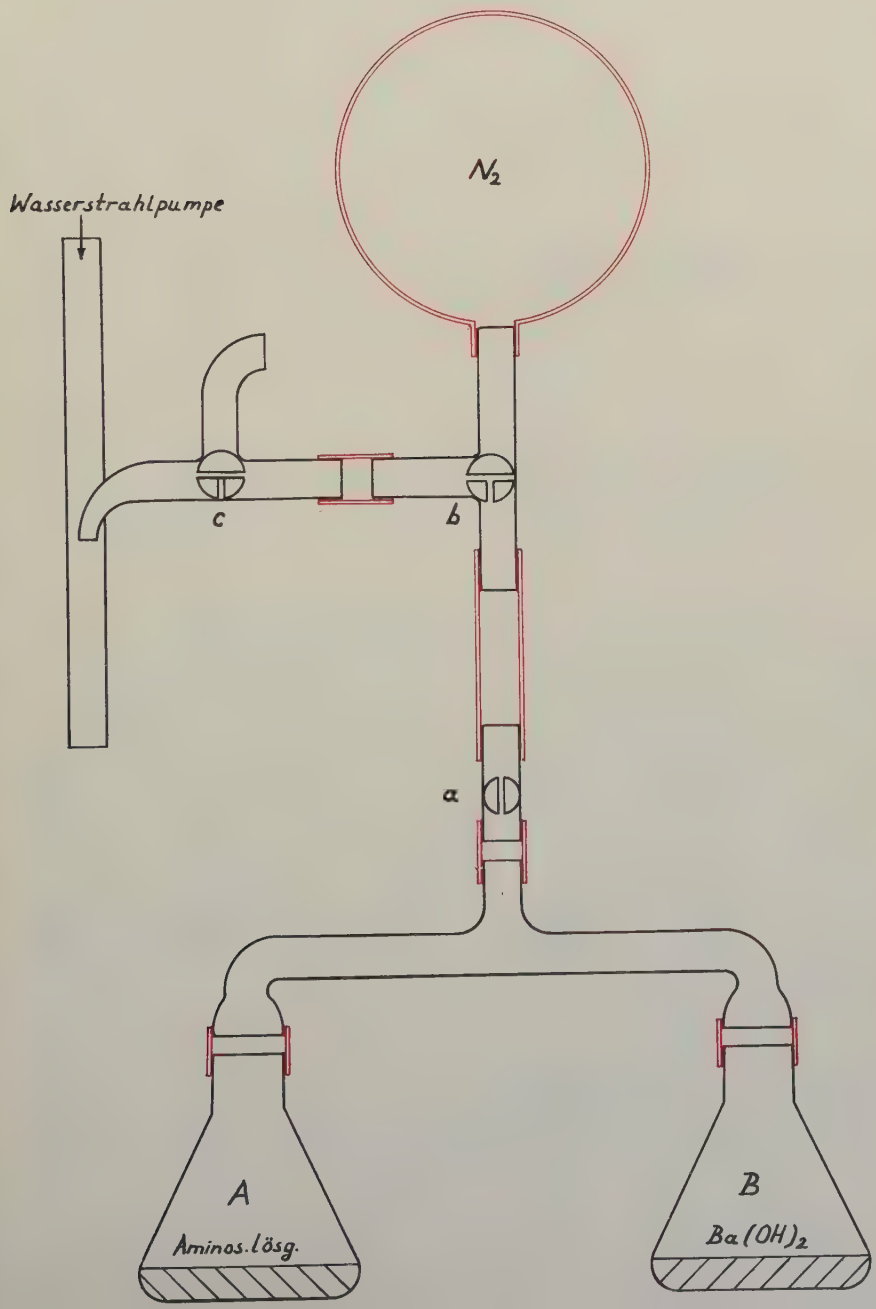
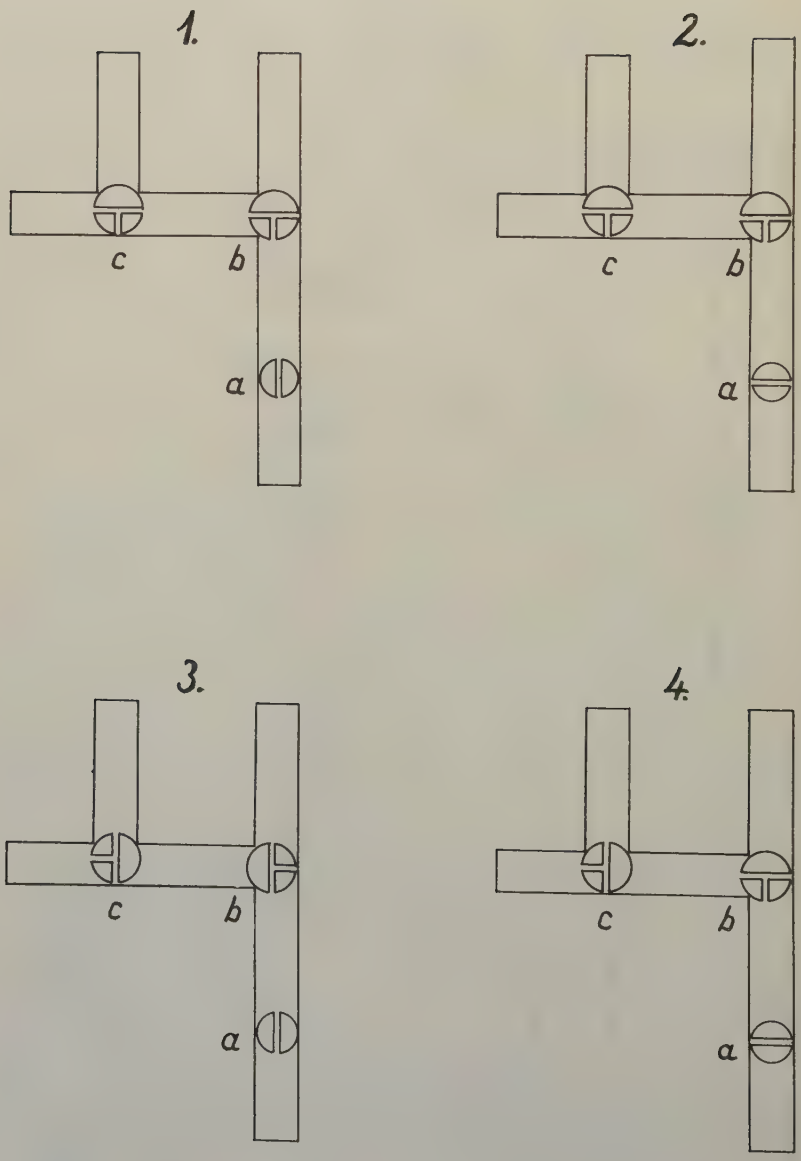


Abb. 2.



4. Gewinnung der Linsen

Die Augen frisch geschlachteter Schweine und Rinder wurden in einem Dewar-Gefäß vom Schlachthof geholt und bis zum Versuchsbeginn im Eisschrank aufbewahrt.

Um die Linse unbeschädigt aus dem Auge entnehmen zu können, wurde die Hornhaut am Limbusumfang herausgeschnitten und danach vorerst noch in situ belassen, um eine Verdunstung intraokularer Flüssigkeit zu verhindern.

Erst direkt vor dem Abwägen der Linse auf der Analysenwaage wurde die Hornhaut abgehoben. Durch einen leichten Druck auf den Bulbus springt dann die Linse aus dem Auge. Sie wurde vorsichtig mit Filtrierpapier von dem anhaftenden Kammerwasser gereinigt und anschließend gewogen.

Beim Rind war, wie schon erwähnt, eine Linse, deren Gewicht bei 2,5 g liegt, für einen Versuch ausreichend. Beim Schwein wurden jeweils drei Linsen, deren Gesamtgewicht im Durchschnitt 1,3 g betrug, zu einer Analyse genommen.

5. Enteiweißen und Eindampfen der Linse

Das Eiweiß der Linse muß ausgefällt werden, da es sonst den Wert des Aminostickstoffs der freien Aminosäuren verfälschen würde. Hierzu wurde das Untersuchungsgut (1 Rinderlinse bzw. 3 Schweinelinsen) in 4 ml aqua destillata gelegt. Dabei dringt Wasser durch die semipermeable Membran der Linsenkapsel in die Linse ein, wodurch diese quillt. Die gequollene Linse wurde dann mit einem Glasstab zerdrückt und diese Linsen-Wasserlösung mit soviel absolutem Alkohol versetzt, daß das Gemisch 80% Alkohol enthielt. Hierzu wurden etwa 20 ml Alkohol gebraucht. Das Eiweiß wird durch die Alkoholzugabe ausgefällt und die milchig-trübe Lösung vorsichtig aufgekocht und abgenutscht. Das entstehende Filtrat ist wasserklar und eiweißfrei. Nach viermaligem sorgfältigen Nachspülen des Filtrats mit aqua dest. betrug die Menge der Probe nun etwa 100 ml, die auf etwa 1 ml eingedampft werden mussten. Dabei wurden

zur Verhinderung eines Siedeverzuges eine Messerspitze Bimsstein und gegen zu starkes Schäumen einige Tropfen Octylalkohol zugesetzt. Das Volumen, des auf etwa 1 ml eingeengten eiweißfreien Linsenextraktes wurde dann abgemessen und in den Kolben A der beschriebenen Apparatur hineingegeben. Eindampfungskolben und Meßzylinder wurden sodann mit so viel reinem Wasser nachgespült, daß das Endvolumen im Kolben A genau 5 ml betrug - das ist die Menge, die van Slyke(7) als obere Grenze für die Mikromethode angegeben hat.

6. Ninhydrinreaktion

Die Lösung wird mit 100 mg Puffersubstanz versetzt, um das gewünschte pH von 4,7 zu erhalten. Zur Entfernung von CO_2 wird der Kolben A mit seinem Inhalt unter Zusatz von etwas Bimsstein kurz aufgekocht und sofort verschlossen, damit kein Kohlendioxyd der Luft einströmen kann. Darauf wird der Kolben A unter fließendem Wasser bis auf 15° abgekühlt.

Der Kolben B wird durch hindurchströmenden Stickstoff von atmosphärischer CO_2 gereinigt. Bei andauerndem N_2-Strom wird 1 ml der 0,125 normalen Bariumhydroxyd-Lösung in den Kolben pipettiert, der anschließend schnell mit einem sauberen Gummistopfen verschlossen wird.

Jetzt öffnet man den Kolben A und gibt 100 mg Ninhydrin in den eiweißfreien Linsenextrakt, während weiterhin N_2 durch die Apparatur strömt. Nach vorherigem Anfeuchten der beiden Gummimanschetten am U-Rohr (zwecks besseren Gleitens) werden die Kolben A und B (am besten je von einer Person) schnell mit dem U-Rohr verbunden. Gleichzeitig wird bei Hahnstellung a (siehe Abb. 2) die Apparatur evacuiert. Hierbei ist Vorsicht geboten, da bei zu plötzlichem starkem Vakuum die Flüssigkeit in A überschäumt. Es wird so lange evacuiert, bis die Linsenlösung in A keine Bläschen mehr schlägt, dann wird der Hahn a geschlossen, und oberhalb desselben das evacuierte U-Rohr mit den Kolben von der übrigen Apparatur getrennt.

Dieser Teil des Apparates wird nun bis unterhalb des

Hahns a in das kochende Wasser eines Wasserbades getaucht. Jetzt vollzieht sich die Ninhydrinreaktion, d.h. die Decarboxylierung der Aminosäuren. Diese Reaktion ist in etwa 7 Min. abgelaufen. Das Eintreten der Reaktion lässt sich schon kurze Zeit nach Versuchsbeginn an einer Violettfärbung des Inhaltes von Kolben A erkennen.

Die bei der Ninhydrinreaktion abgespaltene CO2 muß nun in die Bariumhydroxydlösung herüberdestilliert werden. Dazu bleibt der Kolben A im kochenden Wasserbad; der Kolben B hingegen wird in einen danebenstehenden Behälter mit kaltem Wasser getaucht. Beide Gefäße sollen gleich hoch und bis oben mit Wasser gefüllt sein, damit das U-Rohr möglichst tief ins Wasser taucht.

Die vollständige Destillation der CO_2 aus dem eiweißfreien Linsenextrakt beträgt bei 5 ml Kolbeninhalt drei Minuten. Während dieser Zeit muss der Kolben B ununterbrochen geschüttelt werden, damit die entstandene CO_2 vollständig absorbiert wird. Durch das gebildete Bariumkarbonat wird die Lösung im Kolben B trübe. Das Hinüberdestillieren darf nicht zu stürmisch erfolgen, da sonst gefärbte Linsenlösung nach B überkochen und so die anschließende Titration unmöglich machen würde. Nach der Destillation wird die Apparatur abgekühlt und kann dann verschlossen längere Zeit stehen bleiben.

7. Titration

Das U-Rohr samt Kolben wird wieder mit dem N_2-Ballon und der Wasserstrahlpumpe verbunden (s. Abb.1). Damit bei der Titration kein atmosphärisches Kohlendioxyd aus dem verbliebenen Teil des Apparates in das U-Rohr strömt, wird erst einmal unter Hahnstellung 2 evacuiert, wobei Hahn a noch geschlossen bleibt. Erst dann wird auf Hahnstellung 3 umgeschaltet. Der Reihenfolge nach wird zuerst das Vakuum bei c unterbrochen, dann durch b eine Verbindung von Ballon und dem Teil über dem U-Rohr hergestellt und zuletzt a geöffnet. Unter Zischen kann nun N_2 in die Kolben einströmen. Nun erfolgt Hahnstellung 4; zuerst werden die Kolben und dann der N_2-Ballon geschlossen.

Mit Stickstoff gefüllt kann der Inhalt der verschlossenen Kolben sofort titriert werden oder auch noch längere Zeit stehen bleiben.

Die Titration erfolgt durch 0,02855-n Salzsäurelösung aus einer 5 ml-Bürette mit 1/100 ml Graduierung. Der Kolben B wird von der Apparatur getrennt und in ihn sofort strömender N_2 hineingeleitet. Unter diesem Strom werden zwei Tropfen Phenolphthalein hinzugegeben, die eine Rotfärbung hervorrufen. Bei anhaltendem Strom wird unter Schütteln bis zum Farbumschlag titriert. Die in ml gemessene HCl-Menge wird mit T_2 bezeichnet.

8. Leeranalyse

In jeder Versuchsreihe, meistens wurden zwei oder drei Bestimmungen gleichzeitig durchgeführt, läuft eine Leeranalyse mit. Zu ihr werden die gleichen Mengen der einzelnen Reagentien verwendet und sie unterscheidet sich nur dadurch von den übrigen Bestimmungen, daß bei ihr anstelle des eiweißfreien Linsenextraktes5 ml Wasser in den Kolben A gegeben werden. Außerdem kann man hier das Ninhydrin weglassen, da dieses selbst keine CO_2 entwickelt. Das Vorgehen-nämlich Kochen, Destillieren und Titrieren - ist sonst genau so wie beim Hauptversuch. Die für die Leeranalyse beim Titrieren verbrauchte Menge Salzsäure wird mit T_1 bezeichnet.

9. Berechnung

Aus den beiden bei Titrieren gefundenen Werten T_1 und T_2 läßt sich nach der Formel: (T_1-T_2) multipliziert mit einem Faktor, der Aminostickstoffgehalt der einzelnen Proben berechnen.

Der erforderliche Faktor ergibt sich anhand der folgenden Überlegungen:
$Ba(OH)_2$ reagiert mit CO_2 unter Bildung von Bariumkarbonat und Wasser:

$$BA(OH)_2 + CO_2 = BaCO_3 + H_2O$$

Das Molekulargewicht von $Ba(OH)_2$ = 137,37 + 2 + 32 = 171,37
" " " CO_2 = 44,01

171,37 g $Ba(OH)_2$ binden 44,01 g CO_2.

Berechnung der $Ba(OH)_2$-Menge, die in 1 ml n/8 $Ba(OH)_2$ - Lösung ist: Für die Herstellung einer normalen Lösung von $Ba(OH)_2$ muß das Molekulargewicht durch zwei dividiert werden, da $Ba(OH)_2$ 2 OH-Jonen abgeben kann.

171,37 : 2 = 85,685

In dem beschriebenen Versuch aber wird mit einer $^n/_8$-Lösung gearbeitet.

85,685 : 8 = 10,71.

Das bedeutet, daß zur Herstellung eines Liters einer $^n/_8$ $Ba(OH)_2$-Lösung 10,71 g $Ba(OH)_2$ gebraucht werden. In einem ml $^n/_8$ $Ba(OH)_2$ sind dann 0,01071 g $Ba(OH)_2$.

Berechnung der CO_2-Menge, die 0,01071 g $Ba(OH)_2$ bindet:

171,37 : 44,01 = 0,01071 : X

X = 0,0027505

0,01071 g $Ba(OH)_2$ binden 0,0027505 g CO_2

Zur Neutralisation der n/8 $Ba(OH)_2$-Lösung wird n/35 HCl gebraucht.

Berechnung der Menge n/35 HCl, die zur Neutralisation von 1 ml $Ba(OH)_2$-Lösung gebraucht wird: 4,375 ml n/HCl neutralisieren 1 ml n/8 $Ba(OH)_2$.

Berechnung der CO_2 Menge, die in die $Ba(OH)_2$-Lösung gelangt ist, wenn 1 ml HCl zur Neutralisation gebraucht worden ist:

4,375 n/35 HCl - Lösung neutralisieren 1 ml $Ba(OH)_2$;

da 1 ml $Ba(OH)_2$-Lösung 0,0027505 g CO_2 binden, kann folgende Gleichung aufgestellt werden:

4,375 : 0,0027505 = 1 : X

X = 0,00062869 g

X = 0,62 mg CO_2

Die Menge beträgt 0,62 mg CO_2.

Berechnung des Kohlenstoffanteils an CO_2:

C : CO_2 = 12 : 44 = 3/11

Berechnung des Faktors zur Bestimmung des Carboxylkohlenstoffs:

$$\frac{0{,}62869 \cdot 3}{11} = 0{,}1715.$$

Berechnung des Faktors zur Bestimmung des Carboxyl-Stickstoffs:

$$N : C = 14 : 12 = 14/12.$$

Der Faktor von Stickstoff muß also um 14/12 größer sein als beim Kohlenstoff. 14/12 . 0,1715 = 0,20008

Faktor = 0,2

Die Formel zur Bestimmung des Aminostickstoffs lautet demnach:

$$\underline{(T_1 - T_2) \cdot 0{,}2}$$

B. Quantitative Bestimmung des Aminostickstoffs der Peptide in Rinder- und Schweinelinsen

1. Vorbemerkungen

Wenn die Peptide quantitativ nach der Methode von van Slyke (7) bestimmt werden sollen, müssen sie vorher durch Hydrolyse in ihre Bausteine, die Aminosäuren, gespalten werden. Erst dann kann das van Slyke'sche Verfahren mit Decarboxylierung, Destillation und Titration angewendet werden. Für diesen Fall setzt sich der gefundene Wert $(T_1 - T_2) \cdot 0{,}2$ für Aminostickstoff zusammen einmal aus dem Aminostickstoff der freien Aminosäuren (s.o.) und zum zweiten aus dem Aminostickstoff der durch Hydrolyse erhaltenen Aminosäuren der Peptide. Aus diesem Grund muß zusammen mit jedem Versuch zur Bestimmung der Peptide ein zweiter angesetzt werden, bei dem - wie oben - die gleiche Menge Linsenlösung ohne vorherige Hydrolyse verwendet wird. Aus der Differenz der erhaltenen Werte im Parallel- und Hauptversuch (mit vorausgehender Hydrolyse) ergibt sich dann der Aminostickstoffgehalt der Peptide. Bei den Rinderlinsen wurde

von einer Linse die nach dem Enteiweißen erhaltene Menge an Extrakt in zwei gleiche Teile geteilt, bei den Schweinelinsenversuchen wurden 6 Linsen genommen und das nach dem Enteiweißen gewonnene Extrakt ebenfalls zur Hälfte im Hauptversuch mit und im Parallelversuch ohne vorherige Hydrolyse verwendet. Neben diesem Doppelversuch wurde auch hier gleichzeitig stets eine Leeranalyse zur Ermittlung des T_1-Wertes durchgeführt.

2. Verwendete Chemikalien

wie bei der Bestimmung des Aminostickstoffs der freien Aminosäuren, außerdem rauchende Salzsäure für die Hydrolyse.

3. Zusätzliche Apparatur für die Peptidanalysen

a.) Ein Apparat für die Hydrolyse; er besteht aus einem 40 cm langen Rückflußkühler nach Dimroth, der einem Kolben E von 250 ml aufgesetzt wird.

b.) Ein Apparat zum Abjagen der HCl. Dieser besteht aus einem Kolben E (wie bei 1) aus Jenaer Glas mit eingeschliffenem Hals, dessen Durchmesser 3 cm beträgt und der einen eingeschliffenen Aufsatz trägt, welcher oben eine Öffnung mit Schliffstopfen und eine zweite Öffnung für ein eingeschliffenes Thermometer hat. An der Seite befindet sich eine dritte geschliffene Öffnung für einen Liebig-Kühler von 40 cm Länge. An dem zweiten Ende des Kühlers ist ein Kolben D von 500 ml angebracht, der mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden ist, so daß die ganze Apparatur evacuiert werden kann.

4. Hydrolyse

Die Hydrolyse wird mit dem oben beschriebenen Apparat ausgeführt. In dem Kolben E befinden sich 5 ml Linsenlösung und einige Glaskugeln gegen Siedeverzug. Die Lösung wird zuerst ohne Rückflußkühler bis zur Trockne eingedampft. Darauf wird sie mit 50 ml azeotroper 20%iger Salzsäure versetzt und der Rückflußkühler mit dem Kolben verbunden. Über einem Bunsenbrenner muß die HCl-Linsen-Lösung 8 Std. kochen.

Nach dieser Zeit ist die Hydrolyse beendet. Danach wird der Kolben E an den Verdampfungsapparat angeschlossen und das Hydrolysat bis zur Trockne eingedampft. Darauf werden 50 ml H_2O zugegeben und dann erneut bis zur Trockne eingedampft. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt, um die Salzsäure zu vertreiben. Das Verdampfen von HCl samt Wasser braucht eine lange Zeit, weil die Temperatur 25 - 30° nicht übersteigen soll. Nach dem dritten Eindampfen wird mit Wasser auf 5 ml aufgefüllt, mit Natronlauge neutralisiert und dann die Probe in einen Kolben von 25 ml gegeben. Anschließend erfolgt die Ninhydrinreaktion auf die gleiche Art und Weise wie sie oben bereits beschrieben wurde.

IV. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen

1. Aminostickstoff der freien Aminosäuren

Zur Bestimmung des Aminostickstoffs der freien Aminosäuren wurden 23 Versuche an jeweils 3 (also insgesamt an 69) Schweinelinsen und weitere 13 Analysen von Rinderlinsen durchgeführt. Die in beschriebener Weise vorgenommenen Untersuchungen führten zu den in Tabelle II zusammengestellten Ergebnissen.

Tabelle II: Aminostickstoff der freien Aminosäuren in der Linse von Schwein und Rind

a) Schwein

Gewicht von jeweils 3 Linsen in g	(T_1-T_2). 0,2	mg Aminostickstoff in 1 g Linse
2,400	0,548	0,228
1,218	0,330	0,271
1,265	0,332	0,262
1,284	0,286	0,223
1,279	0,362	0,283
1,267	0,342	0,270
1,239	0,338	0,273
1,172	0,336	0,287
1,290	0,340	0,264
1,166	0,304	0,261
1,221	0,350	0,287
1,439	0,370	0,257
1,217	0,332	0,273
1,324	0,334	0,252
1,224	0,328	0,268
1,413	0,338	0,239
1,219	0,308	0,253
1,376	0,364	0,265
1,336	0,306	0,229
1,234	0,302	0,245
1,436	0,300	0,209
1,398	0,334	0,239
1,265	0,260	0,206

Mittelwert: 0,254

b) Rind

Gewicht von jeweils 3 Linsen in g	(T_1-T_2). 0,2	mg Aminostickstoff in 1 g Linse
2,575	0,692	0,269
2,385	0,554	0,232
2,474	0,620	0,251
2,629	0,672	0,256
2,612	0,668	0,256
2,306	0,594	0,258
3,264	0,664	0,203
2,602	0,334	0,257
2,576	0,676	0,262
1,301	0,334	0,257
1,165	0,320	0,275
1,288	0,338	0,262
1,337	0,376	0,281

Mittelwert: 0,255

Wie aus Tabelle IIa ersichtlich, enthält 1 g Schweinelinse im Durchschnitt 0,254 mg Aminostickstoff der freien Aminosäuren, was einem Wert von 25,4 mg% entspricht. Dabei beträgt die Abweichung der Einzelanalysen (jeweils von 3 Linsen) vom Mittelwert der 23 insgesamt durchgeführten Bestimmungen ± 0,023 mg = ± 9,2%. Diese Streuung liegt durchaus im Bereich des für biologische Methoden üblichen Fehlers.

Aus Tabelle IIb geht hervor, dass der Gehalt von 1 g Rinderlinse an Aminostickstoff der freien Aminosäuren mit durchschnittlich 0,255 mg (= 25,5 mg%) bei etwa gleich großer Streuung (± 0,020 = ± 7,7%) der 13 Einzelwerte dem der Schweinelinse weitgehend entspricht. Die Linse beider Tierspezies enthält also etwa gleich viel freie Aminosäuren.

2. Aminostickstoff der Peptide

Zur Ermittlung des Gehaltes an Aminostickstoff in Peptidbindung wurden zur Orientierung 5 Analysen an jeweils 3 Schweinelinsen und 4 Bestimmungen an je einer Rinderlinse in der oben näher beschriebenen Weise durchgeführt. Die dabei errechneten Werte sind in Tabelle III wiedergegeben.

Tabelle III

Aminostickstoff der Peptide in der Linse von Schwein und Rind

a) Schwein

α			β		β-α
Aminostickstoff der freien Aminosäuren			Aminostickstoff der Peptide + freien Aminosäuren		mg Aminostickstoff der Peptide in 1 g Linse
Gewicht von jeweils 3 Linsen in g	$(T_1-T_2).0,2$	mg Aminostickstoff in 1g Linse	$(T_1-T_2).0,2$	mg Aminostickstoff in 1 g Linse	
1,336	0,306	0,229	0,556	0,416	0,187
1,234	0,302	0,245	0,660	0,535	0,290
1,436	0,300	0,209	0,672	0,468	0,259
1,398	0,334	0,239	0,694	0,496	0,257
1,265	0,260	0,206	0,506	0,400	0,194
	Mittelwert:	0,226	Mittelwert:	0,463	0,237

b) Rind

α			β		β-α
Aminostickstoff der freien Aminosäuren			Aminostickstoff der Peptide + freien Aminosäuren		mg Aminostickstoff der Peptide in 1 g Linse
Gewicht von jeweils 3 Linsen in g	$(T_1-T_2).0,2$	mg Aminostickstoff in 1g Linse	$(T_1-T_2).0,2$	mg Aminostickstoff in 1g Linse	
1,301	0,334	0,257	0,820	0,630	0,373
1,165	0,320	0,275	0,636	0,546	0,271
1,288	0,338	0,262	0,746	0,579	0,317
1,337	0,376	0,281	0,826	0,618	0,337
	Mittelwert:	0,269	Mittelwert:	0,594	0,325

Die in Tabelle III zusammengestellten Ergebnisse zeigen, dass der Amino-Stickstoff der Peptide in 1 g Schweinelinse im Durchschnitt 0,237 mg Aminostickstoff (= 23,7 mg%) betrug. Die Abweichung der 5 Einzelbeobachtungen vom Mittelwert beträgt hier ± 0,047 = 20%. Sie ist damit größer als bei den entsprechenden Werten für die Aminosäuren, was nicht nur durch die relativ kleinere Zahl dieser nur orientierenden Versuche, sondern auch durch die weitaus komplizierteren Versuchsbedingungen bei diesen Experimenten erklärt wird. Der Aminostickstoff der Peptide in der Rinderlinse lag durchschnittlich bei 0,325 mg pro g eiweißfreiem Linsenextrakt (= 32,5 mg%). Die Abweichung vom Mittelwert beträgt hier ± 0,042 = ± 13% und ist damit geringer als in den Schweinelinsen-Versuchen.

V. Besprechung der Ergebnisse.

Auf den ersten Blick möchte es damit scheinen, als ob der Gehalt an Aminostickstoff der Peptide beim Rind höher läge als beim Schwein. (Mittelwert von 4 Analysen beim Rind 32,5 mg%, beim Schwein 23,7 mg%). Dieser Unterschied ist jedoch bei Anwendung des t-Testes statistisch nicht zu sichern; die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt zwischen 2 und 5 %. Es handelt sich damit wohl um einen zufälligen Unterschied der Mittelwerte, der durch die geringe Zahl der Einzelbeobachtungen und die nicht geringen Schwankungen der Einzelwerte zwanglos erklärt wird. Man wird - zumindest auf Grund dieser orientierenden Versuche - sagen müssen, dass sich auch bezüglich des Aminostickstoffs der Peptide gleiche Verhältnisse finden wie beim Stickstoff der freien Aminosäuren: bei beiden Tierarten liegen die entsprechenden Werte in der gleichen Größenordnung. Dieses wird auch ersichtlich, wenn man nach Tabelle IIIa und b den Anteil des Aminostickstoffs der Peptide (Spalte $\beta - \alpha$) mit dem Gesamtaminostickstoff nach Hydrolyse, (Spalte β)in Beziehung setzt; er beträgt bei der Schweinelinse 50% und bei der Rinderlinse 55%.

Da die Werte der freien Aminosäuren sowohl für Schweine- wie für Rinderlinsen praktisch gleich groß sind, dürfte man mit aller Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Werte bei der menschlichen Linse auch um 25mg% liegen.

Der in den eigenen Versuchen gefundene Wert an Gehalt des Aminostickstoffes der freien Aminosäuren läßt sich gut mit den Ergebnissen von M i l a n o (3) vergleichen, der die freien Aminosäuren direkt bestimmte und beim Kaninchen Werte um 40mg% fand. Möglicherweise liegt der Gehalt an Aminosäuren beim Menschen in der gleichen Größenordnung. Genaue Vergleiche zwischen den eigenen Ergebnissen und denen anderer Autoren sind dadurch erschwert, daß Letztere stets die freien Aminisäuren direkt bestimmt haben, während bei den Eigenanalysen, deren Aminostickstoff erfaßt wurde. Aus diesen den Aminostickstoff zu berechnen, würde äußerst kompliziert sein, da die Zahl der Aminosäuren in der Linse sich aus einem nicht bekannten Verhältnis von Monocarbonsäuren und anderen Aminosäuren mit mehreren COO-Gruppen zusammensetzen. Außerdem geben nach H i n g s b e r g (10) einige Aminosäurederivate ihre COO-Gruppe ab und andere nicht; wie z.B. Dimethylglykokoll. β und γ Aminosäuren, deren Anwesenheit im Auge allerdings nicht bestimmt nachgewiesen wurde, reagieren überhaupt nur in ganz geringem Maße.

Untersuchungen über den Aminostickstoffgehalt der Peptide von Rinder- und Schweinelinsen wurden bisher nicht gemacht.

VI. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Aminostickstoff der freien Aminosäuren und der Peptide in Rinder- und Schweinelinsen nach dem Verfahren von van Slyke (7) mit der Ninhydrinreaktion quantitativ erfaßt. Hierbei wird unter Einwirkung von Ninhydrin die COO-Gruppe von den Aminosäuren abgespalten, in Barytlauge aufgefangen und titrimetrisch bestimmt. Aus diesen Werten wurde dann die Menge des Aminostickstoffs errechnet. Sie betrug an freien Aminosäuren bei 23 Versuchen mit 69 Schweinelinsen im Durchschnitt 25,4 mg% und bei 13 Versuchen mit Rinderlinsen im Durchschnitt 25,5 mg%. Die Streuung der Einzelwerte lag unter 10% und damit durchaus im Bereiche des bei biologischen Versuchen Üblichen. In orientierenden Experimenten zur Erfassung des Gehaltes an Aminostickstoff der Peptide ergaben 5 Versuche an 15 Schweinelinsen einen durchschnittlichen Wert von 23,7 mg% und 4 Analysen von Rinderlinsen einen solchen von 32,5 mg%. Es finden sich damit bei beiden Tierarten gleiche Verhältnisse, wobei etwa 50% des nach Hydrolyse erfaßbaren Aministickstoffs in Peptidbindung vorliegen.

VI. Literaturverzeichnis

1.) de Vecchi, J.: Untersuchungen über den Aminosäurengehalt der Linse bei Naphthalinvergiftung.
Rass.ital.Ottalm. 5, 552-565 (1936)
Ref.Zbl.Ophthalm. 38, 512 (1937).

2.) de Vecchi, J.: Untersuchungen über den Aminosäurengehalt der menschlichen Starlinse.
Bollett.d'Occul. 16,400-413 (1937)
Ref.Zbl.Ophthalm. 39,364-365 (1937).

3.) Milano, Achille: Das Verhalten des Gehalts an Aminosäuren in der Kaninchenlinse nach Parathyreoidektomie.
Annali Ottalm. 66, 393-398 (1938)
Ref.Zbl. Ophthalm. 42, 592 (1939).

4.) Milano, Achille: Das Verhalten des Aminosäuregehalts der Linse nach ultravioletter Bestrahlung.
Annal.Ottalm. 67, 541-549 (1939)
Ref.Zbl. Ophthalm. 44,393-394 (1940).

5.) Malatesta, C.: Chromatographisches Studium der freien Aminosäuren in den intraocularen Flüssigkeiten, der Linse und im Blut von Rindern.
Bollet. d'Occulistica 31,685-694(1952
Ref.Zbl. Ophthalm.60,119, (1953)

6.) Malatesta, C.: Chromatographisches Studium der freien Aminosäuren in den intraocularen Flüssigkeiten, der Linse und im Blut von Rindern.
Bollet.d'Occul.31,765-768 (1952).
Ref.Zbl. Ophthalm.60,262 (1953)

7.) van Slyke, D.: Gasometric Determination of Carboxyl Groups in free Amino Acids.
Journal of Biological Chemistry 141, 627 (1941) und 141, 671 (1941).

8.) Kotake, T.: Zur Frage der Tryptophanzersetzung bei der Säurehydrolyse von Eiweiß.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chemie. 270, 44 (1941).

9.) Tristram, G.R.: The Application of Partition Chromatography to the Determination of Monoamino Acids in Proteins.
Biochem.J. 40, 721 (1946).

10.) Hingsberg, K.: Medizinische Chemie XI 808 (1957).

Die Anregung zu dieser Untersuchung verdanke ich Herrn Privatdozent Dr.med. Hans-Joachim K ü c h l e . Außerdem habe ich Herrn Dr.med. K r u e g e r für mannigfache Hinweise in Verbindung mit der Ausführung der Arbeit zu danken.

Herr Prof.Dr. R o h r s c h n e i d e r überließ mir ein Labor der Universitäts-Augenklinik zur Durchführung der wissenschaftlichen Versuche; schließlich war mir auch die Bibliothek des Hauses zugänglich.

Für dieses Entgegenkommen sei zum Abschluß der Arbeit besonders gedankt.

L e b e n s l a u f

Am 25.November 1930 wurde ich, Wenzel Josef Maria Böckenhoff, als Sohn des Guts- und Brennereibesitzers Bernhard Böckenhoff und seiner Ehefrau Elisabeth geb.Geyr, auf dem Böckenhof in Erle bei Dorsten Westf. geboren.

Meine Schulbildung erhielt ich an der Volksschule zu Erle, der Oberschule für Jungen in Borken und dem Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasium in Recklinghausen, wo ich am 26. Februar 1953 meine Reifeprüfung ablegte.

Im Sommer-Semester 1953 begann ich mein Medizinstudium an der Universität zu Münster/Westfalen. Dann ging ich nach München, wo ich an der Ludwig-Maximilians-Universität nach dem Sommer-Halbjahr 1955 mein Physikum bestand. Hier studierte ich mit je einem Semester Unterbrechung in Wien und Paris bis zu meinem Staatsexamen.